

## **Pengaruh Iradiasi Gamma dan Ethyl Methan Sulfonate Terhadap Pembentukan Embriosomatik Kedelai (*Glycine max* L.)**

### ***The Effect of Gamma Irradiation and Ethyl Methan Sulfonate on Somatic Embryo Formation of Soybean (*Glycine max* L.)***

**Ragapadmi Purnamaningsih, Ika Mariska, E.G. Lestari, Sri Hutami dan Rossa Yunita**

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

Jl. Tentara Pelajar No. 3A, Bogor

Email : raga\_padmi@yahoo.com

Diterima 13-3-2014; Diterima dengan revisi 28-3-2014; Disetujui 19-5-2014

#### **ABSTRAK**

**Pengaruh Iradiasi Gamma dan Ethyl Methan Sulfonate Terhadap Pembentukan Embriosomatik Kedelai (*Glycine max* L.).** Kedelai merupakan salah satu sumber protein dan lemak nabati yang penting. Perubahan iklim global berpengaruh terhadap produktivitas kedelai, sehingga diperlukan kultivar-kultivar baru yang mempunyai sifat unggul tertentu agar produktivitas kedelai dapat ditingkatkan. Teknik *in vitro* dengan mutasi dan keragaman somaklonal merupakan metoda alternatif untuk memperoleh varietas baru apabila material genetik sebagai bahan seleksi tidak tersedia. Induksi mutasi dapat dilakukan pada populasi sel embriogenik dengan menggunakan iradiasi sinar gamma atau senyawa kimia, antara lain Ethyl Methan Sulfonate (EMS). Kedua metoda tersebut telah banyak digunakan untuk meningkatkan keragaman genetik tanaman dan telah dihasilkan galur-galur baru dengan sifat unggul. Salah satu masalah penting yang harus dikuasai dalam penerapan teknologi tersebut adalah meregenerasikan sel somatik hasil mutasi dan keragaman somaklonal agar dapat ditumbuhkan menjadi planlet (tunas *in vitro*). Beberapa faktor yang mempengaruhi regenerasi tanaman adalah jenis bahan tanaman, genotipe, komposisi media, dll. Perlakuan keragaman somaklonal dan mutasi yang diberikan dapat menyebabkan kerusakan pada sel sehingga diperlukan modifikasi pada metoda regenerasi yang sudah diketahui agar populasi sel yang hidup setelah perlakuan mutasi dapat tumbuh menjadi tunas-tunas mutan. Tujuan penelitian adalah untuk mendapatkan planlet mutan hasil perlakuan mutasi dengan iradiasi gamma dan EMS. Varietas kedelai yang digunakan adalah Wilis, Burangrang, Baluran dan aksesori No. B 3592. Eksplan yang digunakan adalah embriozigotik muda berasal dari polong yang berumur 12-20 hari setelah penyerbukan. Induksi kalus embriogenik dilakukan dengan menggunakan media MS + vitamin Gamborg (B5) dengan penambahan 2,4-D 20 mg/l dan sukrosa 3%. Kalus yang didapatkan diberi perlakuan mutasi menggunakan sinar gamma pada dosis 400 rad atau direndam dalam larutan EMS (0.1 %, 0.3 %, dan 0.5 %) selama 1, 2 dan 3 jam. Selanjutnya kalus dipindahkan pada media untuk menginduksi pembentukan benih somatik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pembentukan kalus dipengaruhi oleh genotipe tanaman. Pembentukan kalus tertinggi dihasilkan dari Baluran (93.40%) dan terendah Burangrang (75.90%). Perlakuan iradiasi gamma menurunkan pembentukan struktur torpedo, dimana struktur torpedo tertinggi diperoleh dari Burangrang (25.4-26.3/eksplan). Aksesori B 3592 mempunyai kemampuan membentuk struktur torpedo paling tinggi pada semua perlakuan EMS yang digunakan. Perendaman kalus dalam larutan EMS 0.5% selama 1, 2, dan 3 jam menurunkan regenerasinya membentuk struktur torpedo pada semua genotipe. Perlakuan EMS menyebabkan kerusakan sel yang lebih besar dibandingkan dengan iradiasi sinar gamma, ditunjukkan dengan persentase pembentukan struktur torpedo setelah perlakuan EMS (0-15/eksplan) lebih kecil dibanding dengan iradiasi sinar gamma (10.3-26.3/eksplan).

**Kata kunci :** *Glycine max*, iradiasi sinar gamma, Ethyl Methan Sulfonate, embriogenesis somatik

## ABSTRACT

***The Effect of Gamma Irradiation and Ethyl Methan Sulfonate on Somatic Embryo Formation of Soybean (*Glycine max* L.).*** Soybean is a source of protein and vegetable oil. Global climate change affect the productivity of soybean, so that new cultivars that have superior characteristic can be produced. *In vitro* techniques through somaclonal variation and mutation is one alternative for obtaining new varieties when genetic material as the material selection is not available. Mutation induction can be performed on embryogenic cell populations using gamma irradiation or chemical compounds, such as Ethyl Methane Sulfonate (EMS). Both of these methods have been widely used to increase the genetic diversity of plants and have produced new clones with superior characteristic. The main component that must be controlled in the implementation of these technologies is somatic cells regeneration after mutation treatment in order to get *in vitro* shoots. Regeneration methods which are successfully applied to certain varieties, often is not successfully for other varieties of the same species. Some factors that influence it, are such as explants source, genotype, medium composition, genotype, medium composition, etc. Somaclonal variation and mutation treatment can cause cell damage that is sometimes necessary need modifications of the regeneration method that has been produced before. The aim of the experiment was to get cell population and planlet mutation with gamma irradiation and Ethyl Methan Sulfonate (EMS). Young embryozygotic was used as explant came from young pod that was harvested at 12-20 days after fertilization of Wilis, Burangrang and Baluran varieties and accession No B 3592. Embryogenic callus induction was done by using MS media with vitamin B5 added with 20 mg/l of 2,4-D and 3% sucrose. The callus were irradiated by gamma rays 400 rad or dilute in EMS solution with 0.1%, 0.3% and 0.5% concentration for 1, 2, and 3 hours. After mutation treatment, the callus were sub culture for seed somatic induction. The results showed that callus formation was influenced by plant genotype. All genotype were able produced callus, where the highest percentage callus production was Baluran (93.40 %) and the lowest of that was Burangrang (75.90 %). Gamma irradiation reduces formation of torpedo structure. The highest torpedo structure after gamma irradiation was obtained from Burangrang (25.4-26.3/eksplan). Accession B 3592 had the ability to form torpedo structure highest among all treatments EMS used. Callus immersion in a solution of 0.5% EMS for 1, 2, and 3 hours decreased callus regeneration to formed torpedo structure in all genotypes. EMS treatment causes greater cell damage than the gamma-ray, indicated by the percentage of the torpedo structure formation after EMS treatment (0-15/eksplan) which was smaller than the gamma-ray irradiation (10.3-26.3/explant).

**Key words :** *Glycine max*, irradiation gamma rays, Ethyl Methan Sulfonate, somatic embryogenesis

## PENDAHULUAN

Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) merupakan salah satu sumber protein dan lemak nabati yang penting. Kedelai merupakan tanaman pangan penting ketiga setelah padi dan jagung. Di Indonesia, penggunaan utama kedelai adalah untuk bahan baku tahu dan tempe yang mencapai lebih dari 80% dari kebutuhan total. Peningkatan jumlah penduduk Indonesia menyebabkan kebutuhan kedelai semakin meningkat. Sebagai konsekuensi dari meningkatnya permintaan kedelai sebagai sumber protein, maka varietas-varietas baru yang mempunyai kemampuan toleransi

tinggi terhadap cekaman lingkungan, produktivitas tinggi, serta mempunyai kualitas baik sangat diperlukan [1].

Teknik kultur *in vitro* membuka peluang-peluang baru untuk perbaikan sifat genetik berbagai tanaman, khususnya untuk sifat yang tidak tersedia pada plasma nutfah. Keragaman somaklonal merupakan salah satu metoda kultur *in vitro* yang dapat digunakan untuk memperoleh karakter baru yang tidak tersedia pada sumber plasma nutfah yang ada [2]. Penerapan teknik keragaman somaklonal seringkali dikombinasikan dengan mutasi buatan untuk meningkatkan peluang diperolehnya galur-galur harapan yang diinginkan. Mutasi

induksi dapat dilakukan dengan perlakuan bahan mutagen tertentu [3]. Mutagen yang sering digunakan dalam pemuliaan tanaman yaitu mutagen fisik (radiasi sinar X, sinar gamma) dan mutagen kimia (EMS, dES, MMS, dll). Teknik tersebut dapat mempercepat diperolehnya galur-galur baru dengan berbagai sifat atau karakter yang diinginkan [4]. Dengan menggunakan radiasi sinar X dan EMS juga telah dihasilkan berbagai kultivar kedelai tahan terhadap penyakit, tahan nematoda, tahan herbisida, produksi tinggi serta kandungan asam lemak tinggi [5].

Komponen penting utama yang harus dikuasai dalam penerapan metoda keragaman somaklonal dan induksi mutasi adalah dikuasainya teknik regenerasi tanaman. Sistem regenerasi tanaman yang efisien sangat diperlukan untuk meregenerasikan populasi sel/kalus yang telah diberi perlakuan keragaman somaklonal dan mutasi. Berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa metoda regenerasi yang digunakan pada varietas tertentu seringkali tidak berhasil diterapkan pada varietas lainnya walaupun dalam species yang sama. Regenerasi kedelai secara *in vitro* dapat dilakukan melalui embriogenesis somatik [6]. Berbagai bagian tanaman dapat digunakan, antara lain kotiledon muda, daun, batang, embrio muda dan anter.. Regenerasi kedelai melalui embriogenesis somatik merupakan proses yang panjang dan sangat tergantung kepada genotipe yang digunakan. Keberhasilan regenerasi kedelai melalui embriogenesis somatik dipengaruhi oleh berbagai faktor. Efisiensi sistem kultur embriogenik dan pengurangan waktu kultur telah dilaporkan untuk meningkatkan efisiensi regenerasi. Selanjutnya juga dilaporkan adanya perbedaan potensi regenerasi dari 15 kultivar kedelai melalui embriogenesis somatik [7 dan 1]. Dalam laporan tersebut dinyatakan bahwa keberhasilan embriogenesis somatik berbeda-beda tergantung kepada umur genotipe kedelai yang digunakan. Respon embriogenesis somatik kedelai juga dipengaruhi oleh fase

fisiologis dari tetua yang digunakan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa embrio muda yang berasal dari tetua yang tumbuh pada musim dingin mempunyai kemampuan pembentukan embrio somatik lebih rendah dibandingkan dengan jika digunakan tetua yang tumbuh pada musim semi [7]. Komposisi media juga mempengaruhi keberhasilan embriogenesis somatik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jenis auksin terbaik untuk pembentukan embrio somatik kedelai adalah NAA dengan konsentrasi 10 mg/l [1], sedangkan 2,4-D lebih baik untuk pembentukan embrio somatik pada tahap awal [8].

Perlakuan induksi mutasi yang diberikan baik dengan menggunakan iradiasi sinar gamma maupun EMS dapat menyebabkan kerusakan pada sel sehingga menurunkan efisiensi regenerasi kedelai, oleh karena itu diperlukan modifikasi pada formulasi media tumbuh yang digunakan agar massa sel atau kalus hasil perlakuan induksi mutasi dapat diregenerasikan. Penggunaan metoda regenerasi yang tepat, dapat meningkatkan peluang diperolehnya galur-galur mutan harapan.

## BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah benih kedelai varietas Wilis, Baluran, Burangrang, dan aksesori B 3592, alkohol 70%, kloroks, aquades, media dasar Murashige-Skoog (MS), sukrosa, 2,4-D, Kinetin, GA<sub>3</sub>, Ethyl Methan Sulfonate (EMS).

Benih dari empat genotipe kedelai yaitu Burangrang, Baluran, Wilis dan B3592 ditanam di rumah kaca dan dipelihara hingga membentuk polong. Sumber eksplan yang digunakan pada penelitian ini adalah embriozigotik dari polong yang berumur 12-20 hari setelah penyerbukan. Untuk mendapatkan embrio yang steril, maka polong disterilisasi menggunakan alkohol dan kloroks 10% selama 10 menit dan dicuci dengan aquades steril, kemudian diisolasi embrionya. Embrio ditanam pada media untuk menginduksi pembentukan kalus,

yaitu media dasar Murashige-Skoog (MS) + vitamin Gamborg (B5) + 2,4-D 20 mg/l. Botol yang telah ditanami eksplan selanjutnya diletakkan di dalam rak kultur dalam keadaan gelap dengan ditutup menggunakan kain berwarna hitam. Sub kultur dilakukan beberapa kali pada media yang sama untuk menginduksi terjadinya keragaman somaklonal dan agar terbentuk kalus embriogenik. Peubah yang diamati adalah waktu inisiasi terbentuknya kalus, persentase pembentukan kalus embriogenik dan visual kalus dari masing-masing varietas.

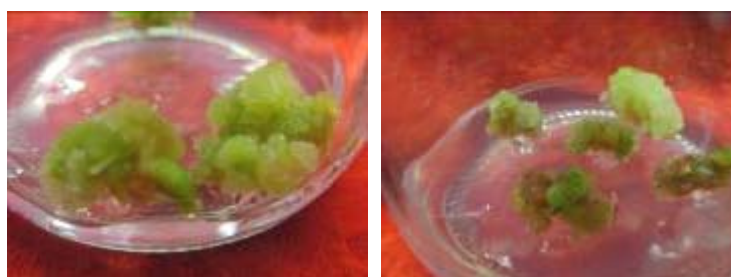
Kalus embriogenik yang dihasilkan selanjutnya diberi perlakuan mutasi dengan menggunakan mutagen fisik (iradiasi sinar gamma) dan mutagen kimia (Ethyl Methan Sulfonate/EMS). Iradiasi kalus dilakukan pada dosis 400 rad berdasarkan hasil penelitian [5], sedangkan Induksi mutasi dengan EMS dilakukan dengan cara merendam kalus dalam larutan EMS pada konsentrasi 0.1, 0.3 dan 0.5 % selama 1, 2 dan 3 jam. Kalus yang telah diberi perlakuan iradiasi atau EMS disubkultur pada media MS dengan penurunan konsentrasi 2,4-D menjadi 10 mg/l selama 3 - 4 minggu untuk menginduksi pembentukan embriosomatik. Masing-masing perlakuan terdiri dari 10 ulangan, dimana masing-masing ulangan terdiri atas 10 eksplan. Peubah yang diamati adalah persentase kalus yang bertahan hidup pada media, persentase pembentukan embriosomatik dari masing-masing varietas serta visual embriosomatik.

Embriosomatik (ES) yang telah terbentuk, selanjutnya diregenerasikan

menjadi benih somatik. Embrio somatik dipindahkan pada media MS dengan menggunakan 2,4-D 0.1 mg/l dengan penambahan Kinetin atau GA pada konsentrasi 0.1 mg/l hingga terbentuk bibit somatik. Botol yang telah ditanami eksplan selanjutnya diletakkan di dalam rak kultur menggunakan lampu TL dengan intensitas penyorotan sebesar 1500 lux selama 16 jam dalam sehari. Masing-masing perlakuan terdiri dari 10 ulangan, dimana masing-masing ulangan terdiri atas 10 eksplan. Peubah yang diamati adalah persentase pembentukan struktur embriosomatik dan benih somatik dari masing-masing varietas serta visual benih somatik.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Keempat genotipe yang digunakan memberikan respon yang baik pada media induksi kalus yang digunakan. Kalus yang diperoleh berwarna putih, bening dan bersifat remah (Gambar 1). Inisiasi kalus mulai terbentuk pada umur 12 - 15 Hari Setelah Tanam (HST). Kalus dengan struktur yang remah dan bersifat embriogenik umumnya mudah diregenerasikan melalui jalur embriogenesis somatik. Persentase pembentukan kalus tertinggi diperoleh dari varietas Baluran (93.40%) dan terendah dari varietas Burangrang (75.95%) (Tabel 1). Namun demikian eksplan yang mudah diinduksi pembentukan kalusnya belum tentu mudah diregenerasikan, karena sifat tersebut sangat tergantung kepada genotipe yang digunakan (*genotype dependent*).



**Gambar 1.** Induksi kalus pada kedelai dari varietas Baluran (kiri) dan Burangrang (kanan)

**Tabel 1.** Persentase pembentukan kalus dari empat genotipe kedelai

Genotipe	Pembentukan kalus (%)	Inisiasi kalus (HST)	Visual kalus
Baluran	93.40	12	Putih, remah
Burangrang	75.95	14	Putih, remah
B 3592	89.44	15	Putih, remah
Wilis	83.12	14	Putih, remah

Formulasi media yang digunakan untuk induksi kalus adalah MS dengan penambahan 2,4-D 20 mg/l. Berbeda dengan hasil penelitian RANJITHA KUMARI *et al.*, [6] pada tanaman kedelai yang menggunakan media MS dengan penambahan 2,4-D 40 mg/l dan BA 0.5 mg/l untuk menginduksi pembentukan kalus kedelai cultivar CO-1 dari eksplan embrio aksis dengan persentase pembentukan kalus sebesar 92.9%. Dalam penelitiannya RADHAKRISHKAN dan RANJITA KUMARI [9] serta RANJITHA KUMARI *et al.*, [6] menggunakan media MS dengan penambahan 2,4-D 3 mg/l dan BA 3 mg/l untuk menginduksi pembentukan kalus

400 rad yang merupakan dosis LD<sub>50</sub> yang diperoleh dari hasil penelitian MARISKA *et al.*, [11], dimana kedelai hasil iradiasi dengan dosis 400 rad dapat menghasilkan mutan yang toleran terhadap lahan masam dan produktivitasnya tetap tinggi. Untuk mengetahui pengaruh perlakuan iradiasi terhadap pembentukan embriosomatik dan regenerasinya membentuk struktur embriosomatik, maka digunakan kalus dari keempat genotipe yang digunakan (Baluran, Burangrang, B 3592 dan Wilis) yang tidak diberi perlakuan mutasi (kontrol). Respon kalus (kontrol) disajikan pada Tabel 2 dan respon kalus setelah perlakuan iradiasi sinar gamma disajikan pada Tabel 3.

**Tabel 2.** Pembentukan embriosomatik dari empat varietas kedelai

Genotipe	Pembentukan embriosomatik (%)	Rata-rata struktur globular/eksplan	Rata-rata struktur torpedo/eksplan
Baluran	35.5	29.5	19.5
Burangrang	55.0	36.2	25.6
B 3592	55.8	38.7	34.2
Wilis	65.7	40.4	29.3

kedelai dari eksplan biji. Menurut KITA *et al.*, [10], 2,4-D merupakan jenis auksin yang umum digunakan untuk induksi embriogenesis pada kedelai. Selanjutnya RANJITHA KUMARI *et al.*, [6] menyatakan beberapa faktor pembatas protokol embriogenesis pada kedelai adalah frekuensi regenerasi yang rendah dan respon induksi kalus dan regenerasinya yang tergantung kepada genotipe yang digunakan.

Induksi mutasi dengan menggunakan iradiasi sinar gamma dilakukan pada dosis

Dari Tabel 2 terlihat bahwa pembentukan embriosomatik dari kalus yang tidak diberi perlakuan iradiasi gamma (kontrol) berkisar antara 35.5 – 65.7%, rata-rata struktur globular per eksplan berkisar antara 29.5 – 40.4%, sedangkan rata-rata struktur torpedo yang dihasilkan adalah 19.5 – 29.3%. Persentase pembentukan embriosomatik tertinggi diperoleh dari Wilis, demikian pula dengan perkembangan embriosomatik yang dihasilkan. Hal ini disebabkan karena Wilis merupakan

varietas yang responsif terhadap kultur *in vitro* [11].

Setelah perlakuan iradiasi, kalus dari keempat varietas dapat berkembang membentuk struktur embriosomatik (Tabel 3). Aksesori B 3592 mempunyai kemampuan membentuk struktur embriosomatik yang paling rendah dibandingkan ketiga genotipe lainnya, namun demikian dalam perkembangannya embriosomatik yang dihasilkan dari aksesori B 3592 dapat berkembang dengan baik hingga membentuk struktur globular dan torpedo (18.7-18.9/eksplan). Sementara itu, perkembangan embriosomatik dari Baluran nampaknya sangat terhambat, sehingga rata-rata jumlah struktur globular dan torpedo yang dihasilkan paling sedikit.

disajikan pada Gambar 2 dan Tabel 4. Dari tabel tersebut terlihat bahwa keempat varietas memberikan respon yang berbeda terhadap perlakuan EMS yang digunakan. Pada umumnya penggunaan konsentrasi EMS yang rendah (1 dan 3%) memberikan persentase kematian kalus yang semakin rendah, demikian juga dengan lamanya perendaman kalus dalam larutan EMS. Hal ini terlihat dari kalus yang berwarna coklat dan tidak dapat berkembang membentuk struktur embriosomatik. Jika dilihat dari dosis EMS yang digunakan dan waktu perendaman, ternyata waktu perendaman lebih berpengaruh terhadap persentase kematian kalus. Kalus yang direndam selama 3 jam pada semua dosis EMS yang digunakan hampir semuanya tidak dapat

**Tabel 3.** Regenerasi kalus membentuk struktur torpedo setelah perlakuan sinar gamma

Varietas	Media	Kalus dengan spot hijau (%)	Pembentukan embriosomatik (%)	Rata-rata struktur globular/eksplan	Rata-rata struktur torpedo/eksplan
Baluran	S 10	48.89	22.22	22.2	10.3
	S 11	59.29	18.18	18.9	10.5
Burangrang	S10	64.79	27.78	30.2	25.4
	S11	80.00	20.00	35.0	26.3
B 3592	S10	55.63	18.05	36.0	18.9
	S11	60.51	15.38	40.0	18.7
Wilis	S10	59.63	29.36	30.5	14.2
	S11	92.31	27.69	30.0	16.2

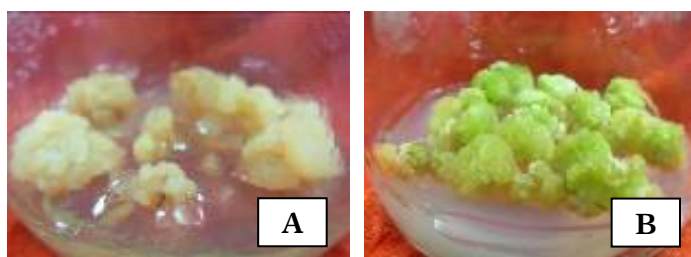
Keterangan: S10 = MS + 2,4-D0.1mg/l + kinetin 0.1mg/l, S11 = MS + 2,4-D0.1mg/l + kinetin 0.1mg/l + GA<sub>3</sub> 0.1 mg/l

Dibandingkan dengan kalus yang tidak diberi perlakuan iradiasi (kontrol), perlakuan iradiasi yang diberikan menyebabkan regenerasi kalus terhambat karena adanya kerusakan pada sel. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian SINGH dan SINGH [12] pada tanaman tebu, dimana semakin tinggi dosis iradiasi yang digunakan menyebabkan kerusakan pada jaringan sehingga menyebabkan penurunan berat kalus.

Selain menggunakan iradiasi sinar gamma, induksi mutasi juga dilakukan dengan menggunakan mutagen fisik, yaitu EMS. Respon kalus setelah perlakuan EMS

tumbuh, kecuali pada Burangrang dan B 3592. Hal ini disebabkan karena makin lama kalus direndam dalam larutan EMS, maka kerusakan sel juga semakin tinggi.

Setelah perlakuan EMS, kalus yang tetap hidup dapat berkembang membentuk struktur globular dan torpedo. Dari keempat genotipe yang digunakan terlihat bahwa Wilis sangat peka terhadap perlakuan EMS yang digunakan, hal ini dilihat dari persentase pencoklatan kalus yang paling tinggi, serta jumlah struktur globular dan torpedo yang paling sedikit dibandingkan genotipe lainnya.



**Gambar 2.** Visual kalus setelah perlakuan EMS  
A. Kalus yang mencoklat setelah perlakuan EMS  
B. Kalus yang tetap hidup setelah perlakuan EMS

**Tabel 4.** Regenerasi kalus membentuk struktur torpedo setelah perendaman dalam larutan EMS

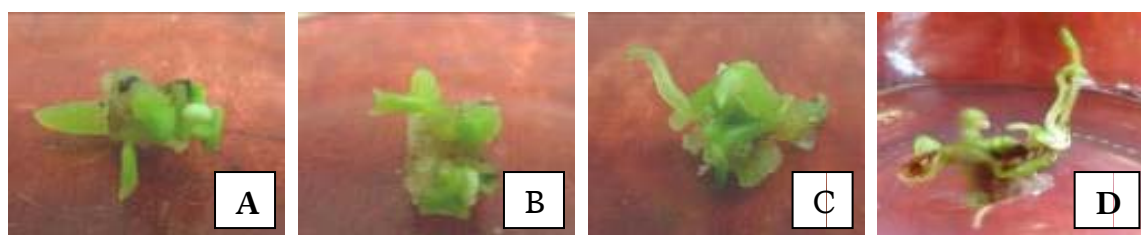
Varietas	Dosis (%)	Waktu perendaman	Spot hijau (%)	Coklat (%)	Rata-rata struktur globular/eksplan	Rata-rata struktur torpedo/eksplan
Baluran	0.1%	1 jam	100.00	0.00	35.0	9.9
		2 jam	85.71	14.29	16.7	5.7
		3 jam	0.00	100.00	0	0
	0.3%	1 jam	15.56	84.44	3.5	1.5
		2 jam	55.56	44.44	8.4	4.2
		3 jam	0.00	100.00	0	0
	0.5%	1 jam	50.00	50.00	22.5	12.0
		2 jam	20.02	79.98	4	2
		3 jam	0.00	100.00	0	0
Burangrang	0.1%	1 jam	100.00	0.00	33.0	11.0
		2 jam	100.00	0.00	30.1	8.2
		3 jam	50.00	50.00	0	0
	0.3%	1 jam	18.33	81.67	10.2	10.0
		2 jam	43.33	56.67	5.6	1.5
		3 jam	94.80	5.20	3.2	1.0
	0.5%	1 jam	100.00	0.00	40.4	0
		2 jam	6.25	93.75	30.1	0
		3 jam	0.00	100.00	0	0
B 3592	0.1%	1 jam	100.00	0.00	20.0	9.9
		2 jam	66.67	33.33	10.1	5.0
		3 jam	25.30	74.70	20.2	5.0
	0.3%	1 jam	60.00	40.00	15.2	11.0
		2 jam	15.30	84.70	0	0
		3 jam	0.00	100.00	0	0
	0.5%	1 jam	13.79	86.21	11.1	6.5
		2 jam	30.00	70.00	10.5	5.9
		3 jam	0.00	100.00	0	0
Wilis	0.1%	1 jam	70.00	30.00	25.7	15.0
		2 jam	33.13	66.87	10.9	5.0
		3 jam	0.00	100.00	0	0
	0.3%	1 jam	53.33	46.67	15.9	5.8
		2 jam	21.40	78.6	9.9	3.5
		3 jam	9.90	90.10	0	0
	0.5%	1 jam	20.00	80.00	0	0
		2 jam	14.90	85.10	0	0
		3 jam	0.00	100.00	0	0



Dibandingkan dengan kalus yang tidak diberi perlakuan EMS (kontrol), nampaknya perlakuan EMS yang diberikan menyebabkan perkembangan kalus terhambat. Hal sama diperoleh dari hasil penelitian GAHUKAR dan JAMBHALE [13] yang menyatakan bahwa peningkatan dosis iradiasi sinar gamma dan EMS menyebabkan penurunan perkembangan kalus.

Kalus yang bertahan hidup setelah perlakuan iradiasi gamma dan EMS serta dapat membentuk struktur globular dan torpedo, diduga merupakan kalus putatif mutan. Perkembangan kalus membentuk struktur globular, torpedo dan kecambah disajikan pada Gambar 3.

Planlet yang dihasilkan dari perlakuan iradiasi sinar gamma dan EMS, diaklimatisasi di rumah kaca. Proses aklimatisasi dilakukan dengan cara memindahkan planlet pada polibag berisi tanah dan pupuk kandang (1:1). Bibit kemudian disungkup selama 2 minggu, setelah itu sungkup dibuka pada sore hari dan ditutup kembali pada pagi hari sehingga bibit dapat beradaptasi dengan lingkungan rumah kaca. Bibit M1 yang dihasilkan dari perlakuan iradiasi sinar gamma dan EMS dapat tumbuh dengan baik di rumah kaca (Gambar 4).



**Gambar 3.** Pembentukan struktur embriosomatik pada kalus hasil mutasi

- A. Struktur globular
- B. Struktur terompet
- C. Struktur torpedo
- D. Embrio yang sudah berkecambah



**Gambar 4.** Aklimatisasi planlet



## KESIMPULAN

Pembentukan kalus kedelai dipengaruhi oleh genotipe tanaman. Pembentukan kalus tertinggi dihasilkan dari Baluran (93.40%) dan terendah Burangrang (75.90%). Perlakuan iradiasi gamma menurunkan pembentukan struktur torpedo, dimana struktur torpedo tertinggi diperoleh dari Burangrang (25.4-26.3/eksplan). Aksesori B 3592 mempunyai kemampuan membentuk struktur torpedo paling tinggi pada semua perlakuan EMS yang digunakan, sedangkan perendaman kalus dalam larutan EMS 0.5% selama 1, 2, dan 3 jam menurunkan regenerasinya membentuk struktur torpedo pada semua genotipe. Perlakuan EMS menyebabkan kerusakan sel yang lebih besar dibandingkan dengan iradiasi sinar gamma, ditunjukkan dengan persentase pembentukan struktur torpedo setelah perlakuan EMS (0-15/eksplan) lebih kecil dibanding dengan iradiasi sinar gamma (10.3-26.3/eksplan).

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kepala Badan Litbang Pertanian yang telah membiayai penelitian ini melalui DIPA Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian T.A. 2009 dengan judul "Pembentukan Mutan Kedelai Berumur 70-80 Hari dengan Ketahanan >60% terhadap Penggerek Polong dan Produktivitas 3 ton/ha".

## DAFTAR PUSTAKA

1. BONACIN, G.A., A.O. DI MAURO, R.C. de OLIVEIRA, and D. PERECIN. Induction of somatic embryogenesis in soybean : physicochemical factors influencing the development of somatic embryos. *Genet. And Mol. Bio.* 34 (4), 865-868 (2000).
2. SUTRISNO. The development of resistant plants through biotechnology, *Buletin Agro Bio.* 4 (1), 9 -12 (2001).
3. SOERANTO, H. Peran iptek nuklir dalam pemuliaan tanaman untuk mendukung industri pertanian. Jakarta. Puslitbang Teknologi Isotop dan Radiasi, Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN) (2003).
4. VAN DEN BULK RW. Application Of Cell And Tissue Culture And *In Vitro* Selection For Disease Resistance Breeding-A Review. *Euphytica* 56:269-285 (1991).
5. SINGH, R.J. and T. HYMOWITZ. Soybean genetic resources and crop improvement. *Genome.* 42, 605 - 616 (1999).
6. RANJITHA KUMARI, B.D., A. SETTU, and G. SUJATHA. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean (*Glycine max* (L.) Merr. *Indian Journal of Biotechnol.* 5, 243-245 (2005).
7. KO, T.-S., S. LEE, S.F. KRASNYSKI, and S.S. KORBAN. Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: Agrobacterium strain and orientation Of immature cotyledonary explants. *Theor. Appl. Genet.* 107, 439-447. (2003).
8. SANTAREM, E.R., B. PELLESIER, and J.J. FINER. Effect of explants orientation. pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 33, 13-19 (1997).
9. RADHAKRISHKAN, R and B.D. RANJITA KUMARI. Callus induction and plant regeneration of Indian soybean (*Glycine max* (L.) Merr. cv. CO3 via half seed explant

- 
- culture. Journal of Agric. Tech. 5, 287-297 (2004).
10. KITA, Y, K. NISHIZAWA, M. TAKAHASHI, and M. ISHIMOTO. Genetic improvement of the somatic embryogenesis and regeneration in soybean and transformation of the improved breeding lines. Plant Cell Rep. DOI 10.1007/s00299-006-0245-z (2006).
11. MARISKA, I., E. SJAMSUDIN, D. SOEPANDI, S. HUTAMI, A. HUSNI, M. KOSMIATIN, dan A. VIVI. Peningkatan ketahanan kedelai terhadap aluminium melalui kultur *in vitro*. Jurnal Litbang Pertanian, **23** (2), 46-52 (2004).
12. SINGH, S.K. and S.B. SINGH. Effect of gamma rays on callus growth and plant regeneration in sugarcane Cv. CO 687. Indian Sugar. 43 (3), 181-182 (1993).
13. GAHUKAR, S.J., and N.D. JAMBHALE. Callus induction and regeneration in *Saccharum* cultivars as influenced by mutagen treatment. J. Maharashtra Agric. Univ. 25 (2), 219-220 (2000).